

## 対応なし、英抄

(19)日本国特許庁 (JP)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2003-9859

(P2003-9859A)

(43)公開日 平成15年1月14日(2003.1.14)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコト*(参考)
C 12 N 15/09		C 12 M 1/00	A 2 G 0 4 2
C 12 M 1/00		C 12 Q 1/68	A 4 B 0 2 4
C 12 Q 1/68		G 01 N 31/22	1 2 1 P 4 B 0 2 9
G 01 N 31/22	1 2 1	33/53	M 4 B 0 6 3
33/53		37/00	1 0 2

審査請求 未請求 請求項の数10 O L (全 9 頁) 最終頁に統く

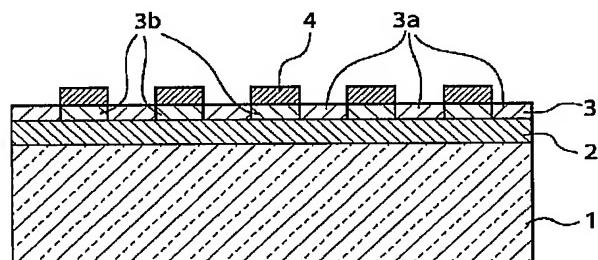
(21)出願番号	特願2001-153957(P2001-153957)	(71)出願人	000004008 日本板硝子株式会社 大阪府大阪市中央区北浜四丁目7番28号
(22)出願日	平成13年5月23日(2001.5.23)	(72)発明者	服部 明彦 大阪府大阪市中央区北浜4丁目7番28号 日本板硝子株式会社内
		(74)代理人	100081880 弁理士 渡部 敏彦 Fターム(参考) 2G042 AA01 BD19 CB03 DA10 HA02 4B024 AA11 CA01 HA19 4B029 AA21 AA23 4B063 QA01 QA13 QQ42 QR33 QR55 QS34

(54)【発明の名称】 核酸固定用基板、核酸固定用基板の製造方法、及びガラスプレート、並びに核酸の解析方法

## (57)【要約】

【課題】 基板表面の所定領域に安定的に核酸を固定化することができるようにした。

【解決手段】 ガラス基板1の表面には光触媒活性を示す光触媒層2(例えばTiO<sub>2</sub>膜)が形成され、該光触媒層2の表面には光触媒作用で分解する撥水性基を有する有機化合物(例えば、フルオロアルキル基を有するシリコン化合物)からなる薄膜3が積層されている。そして、薄膜3は、フォトマスクを介した光照射により相対的に濡れ性の大きな第1の領域3bと濡れ性の小さな第2の領域3aとが規則的に配列された配列パターンを有しており、前記第1の領域3bの表面にのみ核酸固定用化合物膜4が形成され、核酸は前記核酸固定用化合物膜4の膜上に安定的に固定化される。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 濕れ性の大きな第1の領域と濕れ性の小さな第2の領域とを規則的に配列した配列パターンが、ガラス基板の表面に形成されていることを特徴とする核酸固定用基板。

【請求項2】 アミノ基又はカルボキシル基のうちの少なくともいずれか一方の官能基を含有した核酸固定用化合物膜が、前記第1の領域の表面に形成されていることを特徴とする請求項1記載の核酸固定用基板。

【請求項3】 光活性物質からなる光触媒層が前記ガラス基板の表面に形成されると共に、光触媒作用により分解する有機化合物からなる薄膜が前記光触媒層に積層され、前記第1の領域及び前記第2の領域は前記薄膜上にパターン化されて形成されていることを特徴とする請求項1又は請求項2記載の核酸固定用基板。

【請求項4】 光活性物質と光触媒作用により分解する有機化合物とが混在した混成膜が、前記ガラス基板の表面に形成され、前記第1の領域及び前記第2の領域は前記混成膜上にパターン化されて形成されていることを特徴とする請求項1又は請求項2記載の核酸固定用基板。

【請求項5】 光活性を有する光触媒層をガラス基板の表面に形成した後、光触媒作用により分解して濕れ性の変化する有機化合物からなる薄膜を積層し、所定パターンのフォトマスクを介して前記薄膜に光照射を施し、濕れ性の大きな第1の領域と濕れ性の小さな第2の領域とが規則的に配列されたパターンを形成することを特徴とする核酸固定用基板の製造方法。

【請求項6】 光活性を有する光触媒物質と光触媒作用により分解して濕れ性の変化する有機化合物とを含有した混成膜をガラス基板の表面に形成した後、所定パターンのフォトマスクを介して前記混成膜に光照射を施し、濕れ性の大きな第1の領域と濕れ性の小さな第2の領域とが規則的に配列されたパターンを形成することを特徴とする核酸固定用基板の製造方法。

【請求項7】 前記有機化合物は、フルオロアルキルトリアルコキシラン、その加水分解物、又はその縮重合物であることを特徴とする請求項5又は請求項6記載の核酸固定用基板の製造方法。

【請求項8】 前記光活性物質は、チタン酸化物であることを特徴とする請求項5乃至請求項7のいずれかに記載の核酸固定用基板の製造方法。

【請求項9】 請求項1乃至請求項4のいずれかに記載の核酸固定用基板に形成された第1の領域上に核酸が固定化されていることを特徴とするガラスプレート。

【請求項10】 請求項9記載のガラスプレートの核酸固定用基板上に固定化されている核酸の解析を行うことを特徴とする核酸の解析方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は核酸固定用基板、核

酸固定用基板の製造方法、及びガラスプレート、並びに核酸の解析方法に関し、より詳しくは核酸の塩基配列決定、感染症や遺伝病の診断、ゲノム遺伝子の発現モニタリング等、核酸の解析に使用することができる核酸固定用基板とその製造方法、及び該核酸固定用基板上に核酸を固定化させるガラスプレート、並びに該ガラスプレートに固定化された核酸の解析を行う核酸の解析方法に関する。

## 【0002】

10 【從来の技術】 遺伝子工学の分野では、塩基配列決定、感染症や遺伝病の診断、更にはゲノム遺伝子の発現モニタリングにおいて、DNA(デオキシリボ核酸)やRNA(リボ核酸)、或いはこれら混合物で形成された核酸を基板上に固定化して所謂DNAアレーやDNAチップ等の核酸アレー又は核酸チップを作製し、これら核酸アレー又は核酸チップを使用しハイブリダイゼーションによる遺伝子の解析が広く行われている。例えば、ハイブリッドによる塩基配列決定法は、高速かつ低コストな方法として実用化が期待されており(SBH(sequencing by hybridization; R. Drmanac et al., Science, 260, 1649 (1993))、また、DNAアレーを使用した遺伝子発現パターンのモニタリング法(M. Schena et al., Science, 270, 467~470 (1995))は、大量の遺伝子の発現を迅速に解析できる手法として注目されている。

20 【0003】 そして、DNA等の核酸を基板上に固定するための基板素材としては、一般的には樹脂基板、ガラス基板、或いは金属基板等を使用することができるが、放射性同位体を使用せずに蛍光物質を使用してハイブリダイゼーションの検出を行う場合は、蛍光物質を含まないガラス基板やシリコン基板が適していると考えられている。

30 【0004】 しかしながら、核酸固定用基板の基板素材としてガラス基板を使用する場合、ガラス基板はケイ素化合物を主成分とする無機材料で形成されているため、核酸をガラス基板の表面に固定化するのに必要な官能基を有しておらず、このため、核酸をガラス基板表面に固定化させるべく、所定官能基を含有した核酸固定用化合物膜をガラス基板の表面に形成する必要がある。

【0005】 そして、前記所定官能基としては、アミノ基又はカルボキシル基が好ましく、従来より、核酸固定用化合物としてアミノ基を含有したアミノシランを使用し、該アミノシランをガラス基板の表面にコーティングする方法や(Z. Guo et al., Nucl. Acids. Res., 22, p. 5456~p. 5465 (1994))、アミノ基及びカルボキシル基を含有したポリリジンを使用し、該ポリリジンをガラス基板の表面にコーティングする方法(M. Schena et al., Science, 270, 467~470 (1995))が知られている。

## 【0006】

50 【発明が解決しようとする課題】 しかしながら、上述し

た従来技術では、アミノシランやポリリジン等の核酸固定用化合物をガラス基板表面にコーティングした後、治具等を使用して核酸固定用化合物膜上に核酸を固定しているため、核酸固定化の作業中に操作ミス等が生じてガラス基板上の所定領域外に核酸が付着したり、或いは核酸は所定領域内に滴下されたものの、その後に核酸が飛散して所定領域外に付着して固定化する虞があり、所望の核酸アレーや核酸チップを作製するのが困難になる場合が生じるという問題点があった。

【0007】本発明はこのような問題点に鑑みなされたものであって、基板表面の所定領域に安定的に核酸を固定化することのできる核酸固定用基板、核酸固定用基板の製造方法、及び該核酸固定用基板を使用して核酸を所定領域に確実に固定化させることのできるガラスプレート、並びに前記核酸固定用基板上に固定化された核酸の解析を行う核酸の解析方法を提供することを目的とする。

#### 【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者は、核酸をガラス基板上に安定的に固定化させるための核酸固定用化合物膜をガラス基板上の所望領域にのみ形成可能とすべく鋭意研究したところ、核酸固定用化合物のガラス基板への被着性とガラス基板上の濡れ性には相関関係があり、核酸固定用化合物は濡れ性の大きな部分に付着し易く、濡れ性の小さな部分には付着し難いという知見を得た。

【0009】本発明はこのような知見に基づきなされたものであって、本発明に係る核酸固定用基板は、濡れ性の大きな第1の領域と濡れ性の小さな第2の領域とを規則的に配列した配列パターンが、ガラス基板の表面に形成されていることを特徴としている。

【0010】すなわち、上記構成によれば、核酸固定用化合物膜が濡れ性の小さな第2の領域に付着するのを回避しつつ、濡れ性の大きな第1の領域にのみ核酸固定用化合物膜を形成することができ、ガラス基板上の所望領域にのみ核酸を安定的に固定させることができる。

【0011】そして、核酸固定用化合物としては、アミノ基やカルボキシル基を含有した有機化合物が好適する。

【0012】すなわち、本発明の核酸固定用基板は、アミノ基又はカルボキシル基のうちの少なくともいずれか一方の官能基を含有した核酸固定用化合物膜が、前記第1の領域の表面に形成されていることを特徴とするのも好ましく、斯かる構成を具備することにより、第1の領域にのみ核酸を安定的に固定化することが容易に可能となる。

【0013】そして、本発明者は、ガラス基板表面の濡れ性を効果的に異ならせるべく鋭意研究をした結果、チタン酸化物等の光活性物質からなる光触媒層をガラス基板表面に形成すると共に、光触媒作用で分解する有機化合物を光触媒層に積層し、その後、所定パターンを有す

るフォトマスクを介して前記有機化合物膜に光照射を施すことにより、露光処理された部分は光触媒作用により分解して濡れ性が増大し、その結果非露光部との間で濡れ性が顕著に相違するという知見を得た。

【0014】そこで、本発明の核酸固定用基板は、光活性物質からなる光触媒層が前記ガラス基板の表面に形成されると共に、光触媒作用で分解する有機化合物からなる薄膜が前記光触媒層に積層され、前記第1の領域及び前記第2の領域は前記薄膜上にパターン化されて形成されることを特徴としている。

【0015】また、本発明に係る核酸固定用基板の製造方法は、光活性を有する光触媒層をガラス基板の表面に形成した後、光触媒作用で分解して濡れ性の変化する有機化合物からなる薄膜を積層し、所定パターンのフォトマスクを介して前記薄膜に光照射を施し、濡れ性の大きな第1の領域と濡れ性の小さな第2の領域とが規則的に配列されたパターンを形成することを特徴としている。

【0016】そして、本発明者は更に鋭意研究を進めたところ、光活性物質と光触媒作用で分解する有機化合物とを混在させた混成膜をガラス基板上に形成し、上記フォトマスクを介して前記混成膜に光照射を施した場合も、上述と同様、露光処理された薄膜部分は光触媒作用により分解して濡れ性が大きくなり、その結果非露光部との間で濡れ性の相違が顕著になるという知見を得た。

【0017】そこで、本発明の核酸固定用基板は、光活性物質と光触媒作用で分解する有機化合物とが混在した混成膜が、前記ガラス基板の表面に形成され、前記第1の領域及び前記第2の領域は前記混成膜上にパターン化されて形成されていることを特徴とするのも好ましく、また、本発明の核酸固定用基板の製造方法は、光活性を有する光触媒物質と光触媒作用により分解して濡れ性の変化する有機化合物とを含有した混成膜をガラス基板の表面に形成した後、所定パターンのフォトマスクを介して前記混成膜に光照射を施し、濡れ性の大きな第1の領域と濡れ性の小さな第2の領域とが規則的に配列されたパターンを形成することを特徴とするのも好ましい。

【0018】そして、前記有機化合物としては、撥水性基を有する化合物、特にフルオロアルキルトリアルコキシシラン、その加水分解物、又はその縮合物を使用するのが好ましく、また、前記光活性物質としては、光触媒作用に特に優れたチタン酸化物を使用するのが好ましい。

【0019】また、本発明に係るガラスプレートは、上記核酸固定用基板に形成された第1の領域上に核酸が固定化されていることを特徴としている。

【0020】上記ガラスプレートによれば、核酸固定用化合物膜が濡れ性の大きな第1の領域にのみ形成されているので、核酸を第1の領域にのみ安定的に固定化することが可能となり、所望の規則的な配列パターンを有する核酸アレーや核酸チップを容易に得ることができる。

【0021】また、本発明に係る核酸の解析方法は、ガラスプレートの核酸固定用基板上に固定化されている核酸の解析を行うことを特徴としている。

【0022】上記解析方法によれば、ガラスプレート上に規則的に配列された核酸試料を解析することができるので、塩基配列の決定や感染症、遺伝的疾患等の種々の遺伝子解析を効率良く行うことが可能となる。

#### 【0023】

【発明の実施の形態】次に、本発明の実施の形態を図面を参照しながら詳説する。

【0024】図1は本発明に係る核酸固定用基板の一実施の形態を模式的に示した断面図であって、アルミニウム酸塩等で形成された無アルカリのガラス基板1の表面には光触媒活性を示す光触媒層2が形成され、該光触媒層2の表面には光触媒作用で分解する有機化合物からなる薄膜3が積層されている。そして、該薄膜3は、相対的に濡れ性の大きな第1の領域3bと、濡れ性の小さな第2の領域3aとが規則的に配列された配列パターンを有しており、前記第1の領域3bの表面には核酸固定用化合物膜4が形成されている。

【0025】光触媒層2は、TiO<sub>2</sub>、ZnO、WO<sub>3</sub>、Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、SrTiO<sub>3</sub>、In<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、MoO<sub>2</sub>、TiO<sub>2</sub>-Pt-RuO<sub>2</sub>等の光触媒活性物質で形成され、厚膜が10nm～200nmに形成されている。

【0026】前記薄膜3は、光照射による光触媒作用で分解して濡れ性の変化する有機化合物、例えば撥水性基を有する有機化合物からなり、該薄膜3の膜厚は、1nm～100nm、好ましくは1nm～50nmに形成される。また、第1の領域3b及び第2の領域3aは、1辺が10μm～500μmの正方形、又は直径が10μm～500μmの円形、或いは橢円形や正六角形等所望の形状に碁盤目状にパターン化されて形成されている。

【0027】また、薄膜3を形成する有機化合物としては、1個又は2個以上のアルキル基(C<sub>n</sub>H<sub>2n+1</sub>)(nは1以上の整数；以下「同じ」)やフルオロアルキル基(C<sub>n</sub>F<sub>2n+1</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>)を含有したシラン化合物を使用することができる。

【0028】具体的には、アルキル基を含有したシラン化合物としては、一般式C<sub>n</sub>H<sub>2n+1</sub>SiCl<sub>3</sub>、(C<sub>n</sub>H<sub>2n+1</sub>)<sub>2</sub>SiCl<sub>2</sub>、(C<sub>n</sub>H<sub>2n+1</sub>)<sub>3</sub>SiClで示されるクロロシラン化合物、一般式C<sub>n</sub>H<sub>2n+1</sub>Si(OCH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>、(C<sub>n</sub>H<sub>2n+1</sub>)<sub>2</sub>Si(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、(C<sub>n</sub>H<sub>2n+1</sub>)<sub>3</sub>SiOC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>、C<sub>n</sub>H<sub>2n+1</sub>Si(O<sub>2</sub>C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>、(C<sub>n</sub>H<sub>2n+1</sub>)<sub>2</sub>Si(O<sub>2</sub>C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>、(C<sub>n</sub>H<sub>2n+1</sub>)<sub>3</sub>SiOC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>で示されるアルコキシラン化合物、一般式C<sub>n</sub>H<sub>2n+1</sub>Si(OOCCH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>、(C<sub>n</sub>H<sub>2n+1</sub>)<sub>2</sub>Si(OOCCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、(C<sub>n</sub>H<sub>2n+1</sub>)<sub>3</sub>SiOCOC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>で示されるアシロキシラン化合物、一般式C<sub>n</sub>H<sub>2n+1</sub>Si(NCO)<sub>3</sub>や、(C<sub>n</sub>H<sub>2n+1</sub>)<sub>2</sub>Si(NCO)<sub>2</sub>、(C<sub>n</sub>H<sub>2n+1</sub>)<sub>3</sub>SiNCOで示されるイソシアネートシラン化

合物を挙げることができる。

【0029】また、フルオロアルキル基を含有したシラン化合物としては、一般式C<sub>n</sub>F<sub>2n+1</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SiCl<sub>3</sub>で示されるトリクロロシラン化合物、一般式C<sub>n</sub>F<sub>2n+1</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>Si(OCH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>、C<sub>n</sub>F<sub>2n+1</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>Si(OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>で示されるトリアルコキシラン化合物、一般式C<sub>n</sub>F<sub>2n+1</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>Si(OOCCH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>で示されるトリアシロキシラン化合物、一般式C<sub>n</sub>F<sub>2n+1</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>Si(NCO)<sub>3</sub>で示されるトリイソシアネートシラン化合物を挙げることができ、これらフルオロアルキル基を含有したシラン化合物では、フッ素原子の個数が13～22のフルオロアルキルトリメチキシランやフルオロアルキルトリエトキシランを使用するのが好ましい。

【0030】また、核酸固定用化合物としては、アミノ基を含有したアミノシラン化合物、アミノ基とカルボキシル基の双方を含有したポリリジン((NH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH(NH<sub>2</sub>)COOH)<sub>n</sub>)等のポリマーを使用することができる。

【0031】次に、上記核酸固定用基板の製造方法について説明する。

【0032】図2は本発明に係る核酸固定用基板の製造方法を示す製造工程図である。

【0033】まず、図2(a)に示すように、ガラス基板1の表面に光触媒層2を形成する。すなわち、光触媒活性を示すTiO<sub>2</sub>やZnO等の酸化物を使用し、ゾルゲル法、真空蒸着法、化学気相蒸着法(CVD法)、スピッタリング法、微粒子焼き付け法等の薄膜形成方法により膜厚10nm～100nmの光触媒層2を形成する。例えば、ゾル-ゲル法でTiO<sub>2</sub>からなる光触媒層2を形成する場合は、チタンにアルコールを結合させたチタンアルコキンドやチタンアセチルアセトネート、チタンカルボキシレートのような有機チタン化合物溶液をディップコート法、スピニコート法、スプレー-コート法等でガラス基板1の表面に塗布し、TiO<sub>2</sub>微粒子を析出させてTiO<sub>2</sub>ゾルを形成する。そしてその後10分～2時間の間、450℃～550℃の加熱温度で熱処理を行ってTiO<sub>2</sub>ゾルをゲル化し、これによりTiO<sub>2</sub>からなる光触媒層2を形成する。

【0034】また、市販の光触媒活性微粒子、例えばTiO<sub>2</sub>微粒子を水やエチルアルコール等のバインダに分散させた分散ゾルを作製し、該分散ゾルをガラス基板1の表面に塗布した後、上述と略同等の条件で熱処理を行うことによっても前記光触媒層2をガラス基板1の表面上に容易に形成することができる。

【0035】次に、図2(b)に示すように、光触媒作用で分解して濡れ性の変化する有機化合物、例えば撥水性の官能基を含有したフルオロトリアルコキシラン等の有機化合物を使用し、ゾルゲル法、真空蒸着法、CVD法等により光触媒層2上に前記有機化合物からなる

薄膜3を形成する。

【0036】次いで、図2(c)に示すように、所定形状の孔5aが多数設けられたフォトマスク5を前記薄膜3の表面に被せ、矢印Aに示すように上方から紫外線を照射する。なお、フォトマスク5の孔5aは、形成すべき核酸固定領域の底面形状と一致した形状に形成されている。

【0037】このようにして露光部は光触媒作用により分解し、その結果露光部での濡れ性が増大することとなる。すなわち、フォトマスク5により薄膜3は光透過領域と光遮断領域とに区分されると共に光透過領域に対応する薄膜部分は露光されて光触媒作用により分解し、薄膜を構成する有機化合物は撥水性を失って濡れ性が大きくなり、その結果、薄膜3は相対的に濡れ性の大きな第1の領域3bと濡れ性の小さな第2の領域3aとに区分される。例えば、前記薄膜3がフルオロアルキル基を含有了したアルコキシラン又はその加水分解物や縮合物で形成されている場合は、非露光部は撥水性を失わないため濡れ性に変化は生じないが、露光部はフルオロアルキル基が光触媒の作用により分解して撥水性が失われて大きくなり、薄膜3上には第1の領域3bと第2の領域3aとを有する規則的な配列パターンが形成される。

【0038】尚、この光照射により光触媒層の光活性を発現させ、露光部と非露光部とで表面エネルギーの異なる領域が周期的に存在するパターン構造を作製することになるが、この光照射用いる光線として光触媒層中の光触媒活性物質が光触媒活性を示すものであればよく、励起波長が380nm以下の紫外線を使用するのが好ましい。

【0039】次に、図2(e)に示すように、核酸を固定するのに適切な官能基、例えばアミノ基を含有したアミノシラン化合物や、アミノ基及びカルボキシル基を含有したポリリジン等の核酸固定用化合物を濡れ性の大きな第1の領域1aの表面に形成する。尚、被覆形成方法としてはキャスト法、ディップコート法、スピンドルコート法、グラビアコート法、フレキソ印刷法、ロールコート法、スプレーコート法などを使用することができる。

【0040】特に、スプレーコート法は、核酸固定用化合物溶液が液滴状で基板に付着するため、一旦濡れ性の小さな第2の領域3aに付着しても濡れ性の大きな第1の領域3bに移動しやすく、したがってスピンドルコート法を使用した場合は、核酸固定用化合物は濡れ性の大きな第1の領域3bのみに塗布されることとなり、好ましい。

【0041】そしてその後、加熱処理や自然乾燥処理等を適宜組み合わせて水分を除去し、これによりガラス基板1上には第1の領域3bのみに核酸固定用化合物膜4が塗布された核酸固定用基板が得られる。

【0042】このようにして得られた核酸固定用基板の第1の領域3bの表面に、図3に示すように、核酸6を

固定化することにより、所定パターンの核酸6が規則的に配列されたガラスプレートが製造される。

【0043】固定化される核酸6としては、DNA或いはRNAのいずれでもよく、また核酸6の分子量も特に限定されず、また合成したオリゴヌクレオチドや天然の核酸でもよく、またPCR産物等を使用してもよい。

【0044】尚、塩基配列の解析を目的として本ガラスプレートに固定化された核酸(オリゴヌクレオチドを含む)ハイブリダイゼーションによって行う場合、試料核酸又は本ガラスプレートに固定化された核酸のいずれかを予め標識化されているのが好ましい。標識化の方法は特に限定されるものではなく、例えば、放射性同位体や蛍光色素を使用する方法がある。ハイブリダイゼーションの結果は、各種標識法に即した方法によつて測定することができるが、遺伝子発現モニタリング法においては、試料核酸を検出波長の異なる複数の蛍光色素で標識することにより、試料核酸間の発現の強弱を並行して検出できるため、蛍光色素を使用した蛍光法による標識を使用するのが好ましい。

【0045】尚、核酸6の核酸固定用基板への固定化は、適量の核酸溶液を核酸固定用化合物膜4に滴下し、乾燥、紫外線照射または両者を併用することにより行うことができるが、安定的に固定化するためには紫外線を照射するのが好ましい。また、核酸の解析を考慮すると、核酸固定用基板上に固定されていない核酸等を取り除くため各種の酸、熱湯、アルコール等を使用して後処理を行うのが好ましく、無水コハク酸を1-メチル-2-ビロリドン溶液に溶解して所定量のホウ酸ナトリウム溶液を添加したSMP溶液を使用して後処理を使用するのがより好ましい。

【0046】尚、これらの最適な条件は、各種の遺伝子解析方法による測定結果に基づいて、条件を適宜変更することにより決定することができる。

【0047】このようにして核酸が固定化されたガラスプレートは、核酸アレー或は核酸チップとして各種遺伝子解析を行う際に利用される。

【0048】尚、核酸アレーの作製方法としては、その他にも核酸固定用基板上で直接オリゴヌクレオチドを合成する方法や、合成したオリゴヌクレオチド、または、PCR産物等を核酸固定用基板に固定化する方法を使用してもよい。

【0049】そして、このようにして作製されたガラスプレートは、核酸固定化量が安定しており、特にハイブリダイゼーション法により遺伝子を解析しようとする場合は、感度も良好であり、定量的且つ再現性に優れ、繰り返し使用することができる。

【0050】また上記ガラスプレートを使用して核酸の解析方法をとしては、塩基配列解析への応用があり、ハイブリダイゼーション法を使用したDNA塩基配列の決

定や感染症及び遺伝的疾患の診断等を行うことができ、これらの解析方法を巨大ゲノムDNAのマッピングや遺伝子発現モニタリング等に応用することができる。

【0051】具体的には、感染症の診断法としては、例えば、被験者の血液等よりDNAを抽出し、そのDNAに対して各種病原体固有の配列から本発明の方法によりDNAプローブを作製してハイブリダイゼーション反応を行い、病原体の存在を検出する方法がある。

【0052】また、遺伝的疾患の診断法としては、遺伝病の原因遺伝子に特異的な配列に基づいてオリゴヌクレオチドを作製し、被験者より得た染色体DNAとのハイブリダイゼーションを行い、その遺伝子中の変異の有無を検出する方法がある。

【0053】また、巨大ゲノムDNAのマッピングはゲノムDNA解析プロジェクト等には必須の技術であるが、本方法で作製した多数のDNAプローブをゲノムバンク中のDNAとハイブリダイゼーションさせることにより、各クローニングのゲノム上での配置を効率的に決定することができる。

【0054】尚、本発明の核酸固定用基板は上記実施の形態に限定されるものではない。

【0055】図4は本核酸固定用基板の第2の実施の形態を示す要部断面図であって、本第2の実施の形態では光活性物質（例えば、TiO<sub>2</sub>）と撥水性基を含有したアミノシラン等の有機化合物とが混在した混成層6が形成されると共に、該混成層7が濡れ性の大きい第1の領域7bと濡れ性の小さい第2の領域7aに区分され、第1の領域7bの表面に核酸固定用化合物膜4が形成されている。

【0056】すなわち、第1の実施の形態と同様のフォトマスク5を混成層7に被せて光照射を施すことにより、露光部は濡れ性が増大し、濡れ性の大きな第1の領域7bと濡れ性の小さな第2の領域7aが形成され、これにより第1の実施の形態と同様、濡れ性の大きな第1の領域7bの表面上に核酸固定用化合物膜を容易に形成することができる。

#### 【0057】

【実施例】次に、本発明の実施例を具体的に説明する。

【0058】まず、本発明者は光活性物質としてのTiO<sub>2</sub>ゾルを作製した。すなわち、有機チタン化合物としてチタニウムn-ブトキシドを使用し、このチタニウムn-ブトキシド0.1モルをエチルアルコール16モルで希釈し、この希釈した溶液にアセト酢酸エチル0.1モルを添加して安定化させた。そして、硝酸を0.01モル/lの濃度で水に溶解させた希硝酸0.2モルを前記希釈溶液に添加して攪拌し、これによりTiO<sub>2</sub>ゾルを作製した。

【0059】次に、25mm×76mm×1.1mmの大きさを有するアルミニウムケイ酸塩系ガラス組成からなる無アルカリのガラス基板を上記TiO<sub>2</sub>ゾルの浴中

に浸漬し、引き上げ速度1.1mm/secでガラス基板の引き上げ操作を行うことにより該ガラス基板にディップコーティング処理を施し、その後温度500°Cで30分間加熱処理を施し、アナターゼ型酸化チタンからなる膜厚が約20mmの光触媒層(TiO<sub>2</sub>膜)をガラス基板の表面に形成した。

【0060】次に、光触媒作用で分解する有機化合物として撥水性基であるフルオロアルキル基を含有したヘプタデカフルオロデシルトリメトキシシラン（以下、「FAS」という）を使用し、該FAS0.01モルをインプロビルアルコール2.0モルで希釈した後、0.06重量%の希硝酸0.02モルを添加し、フラスコ内で攪拌してFASゾルを作製した。

【0061】次いで、光触媒層（酸化チタン膜）が形成されたガラス基板とFASゾルとを密閉された電気炉中に格納し、温度240°Cで30分間加熱処理を施し、これにより膜厚が数nmの薄膜(FAS膜)を光触媒層上面に積層した。

【0062】次に、本発明者は、中心間距離が175μmで直径150μmの孔が碁盤目状に2000個設けられたフォトマスクを用意した。そして、該フォトマスクを薄膜(FAS膜)に被せると共に、超高圧水銀灯（ウシオ電機社製；「UIS-25102」(250W、光波長250nm~450nm)）を使用し、波長220~310nm、照度23.0mW/cm<sup>2</sup>、及び波長310nm~390nm、照度73.0mW/cm<sup>2</sup>の光を上方から5分間照射した。

【0063】そしてこれにより、フォトマスクに遮蔽されて光照射されなかった非露光部は濡れ性に変化が生じないが、光照射された露光部は、FASのフルオロアルキル鎖が光触媒作用により分解して蒸発し、FASはヒドロキシシロキサン又はヒドロキシポリシロキサンに変化し、濡れ性が大きくなる。すなわち、フォトマスクを介した光照射により濡れ性の大きな第1の領域と濡れ性の小さな第2の領域とが規則的に配列された配列パターンがガラス基板上に形成されることとなる。

【0064】尚、薄膜(FAS膜)の露光部と非露光部に対し、水を滴下し、図5に示すように接触角θ（図中、符号θは水滴を示す）を接触角計（脇和界面科学社製；CA-DT）で測定したところ、非露光部の接触角θは108°と大きかったのに対し、露光部の接触角θは5°と小さく、したがって露光部は非露光部分に比べ表面の濡れ性が大きいことが確認された。

【0065】次に、本発明者は、バーニングされたガラス基板の第1の領域に核酸固定用化合物を積層した。

【0066】すなわち、バーニングされた各ガラス基板を350mlのポリレジン溶液に1時間浸漬した後、該ガラス基板をマイクロタイタープレートキャリア上で回転数8.33s<sup>-1</sup>(500rpm)で遠心させてガラス表面の液体を除去し、さらにガラス基板を風乾し

た後、5分間、温度40°Cで保温し、その後室温で保存し、これにより核酸固定用化合物膜を第1の領域に積層し、核酸固定用基板を得た。

【0067】次に、このようにして得られた核酸固定用基板の表面に核酸としてのDNAを固定してガラスプレートを作製した。

【0068】具体的には、まず、DNAとしてプラスミドpGEM5Zf(+)（米プロメガ社製）を使用し、LabelIT（宝酒造社製）を用いて、蛍光標識（フルオレセイン）により標識化を行った。

【0069】次に、このようにして標識したDNAを0.5mg/mlの濃度となるように調製し、斯く調製されたDNA $1\mu l$ を、上記核酸固定用基板（ポリレリジンコートガラス基板）に滴下した。

【0070】次いで、核酸用固定基板上に滴下されたDNAを風乾した後、湿潤箱中、温度45°Cで1分間保温し、その後このガラスプレートを温度100°Cのホットプレート上で5秒間の瞬間乾燥処理を施した後、UVクロスリンカ（フナコシ社製）を使用して60mJの紫外線（波長254nm）を照射した。

【0071】次いで、本発明者はSMP溶液を作製し、上記核酸固定用基板をSMP溶液に10分間に浸漬させた。すなわち315mlの1-メチル-2-ピロリドンに5gの無水コハク酸を溶解し、さらに0.2Mのホウ酸ナトリウム溶液（pH8.0）を35ml添加してSMP溶液を作製し、斯く作製されたSMP溶液に核酸固定用基板を10分間浸漬した。

【0072】次に、95°Cの熱湯で2分間洗浄した後、95重量%のエチルアルコールで1分間洗浄し、さらに核酸固定用基板をマイクロタイタープレートキャリア上で $8.3 s^{-1}$ （500rpm）で遠心し、ガラス表面の液体を除去した。

【0073】一方、本発明者は、ガラス基板上に直接ポリレジンが積層された基板を作製し、該基板にDNA $1\mu l$ を滴下し、上述と同様の処理を行つて比較例のガラスプレートを作製した。

【0074】このようにして、本発明者は実施例及び比較例のガラスプレートを各30枚宛作製し、その後、ガラスプレート上のDNAの蛍光量を定量し、DNAの固定化状態を評価した。尚、蛍光量の検出はフルオロイメージヤ（Fluorolmager）（米モレキュラーダイナミック社）を使用した。

【0075】DNAの所望領域への固定化状態評価は、比較例のDNAの滴下部分とその周辺部分との蛍光強度比を「1」とし、実施例のDNAとの相対比較で評価した。その結果、実施例は比較例に比べて約10倍の蛍光強度比でDNAが所望領域のみに固定されていることが確認された。

#### 【0076】

【発明の効果】以上詳述したように本発明に係る核酸固

定用基板は、濡れ性の大きな第1の領域と濡れ性の小さな第2の領域とを規則的に配列した配列パターンが、ガラス基板の表面に形成されているので、濡れ性の小さな第2の領域に核酸が付着するのを回避しつつ、濡れ性の大きな第1の領域に核酸が安定的に固定化され、ガラス基板上の所望領域に核酸を安定的に固定させることができる。

【0077】また、本発明の核酸固定用基板は、アミノ基又はカルボキシル基のうちの少なくともいずれか一方の官能基を含有した核酸固定用化合物膜が、前記第1の領域の表面に形成されているので、第1の領域にのみ核酸を安定的に固定化することが容易に可能となる。

【0078】また、本発明の核酸固定用基板は、光活性物質からなる光触媒層が前記ガラス基板の表面に形成されると共に、光触媒作用で分解する有機化合物からなる薄膜が前記光触媒層に積層され、前記第1の領域及び前記第2の領域は前記薄膜上にパターン化されて形成され、或いは光活性物質と光触媒作用により分解する有機化合物とが混在した混成膜が、前記ガラス基板の表面に形成され、前記第1の領域及び前記第2の領域は前記混成膜上にパターン化されて形成されているので、濡れ性の大きな第1の領域にのみ核酸を安定的に固定化させることができる。

【0079】また、本発明に係る核酸固定用基板の製造方法は、光活性を有する光触媒層をガラス基板の表面に形成した後、光触媒作用により分解して濡れ性の変化する有機化合物からなる薄膜を積層し、所定パターンのフォトマスクを介して前記薄膜に光照射を施し、濡れ性の大きな第1の領域と濡れ性の小さな第2の領域とが規則的に配列されたパターンを形成し、或いは光活性を有する光触媒物質と光触媒作用により分解して濡れ性の変化する有機化合物とを含有した混成膜をガラス基板の表面に形成した後、所定パターンのフォトマスクを介して前記混成膜に光照射を施し、濡れ性の大きな第1の領域と濡れ性の小さな第2の領域とが規則的に配列されたパターンを形成しているので、露光処理された薄膜部分は光触媒作用により分解して濡れ性が大きくなり、濡れ性の大きくなつた第1の領域と濡れ性に変化がなく、したがつて濡れ性の小さな第2の領域とが規則的に配列された核酸固定用基板を製造することができる。

【0080】そして、前記有機化合物として、フルオロアルキルトリアルコキシラン、その加水分解物、又はその縮重合物を使用することにより、撥水性基であるフルオロアルキル基が光触媒作用により分解して蒸発し、これにより露光部の濡れ性を大きくすることが容易に可能となる。

【0081】また、前記光活性物質として、チタン酸化物を使用することにより、容易に所望の光触媒作用を得ることができる。

【0082】また、本発明に係るガラスプレートは、上

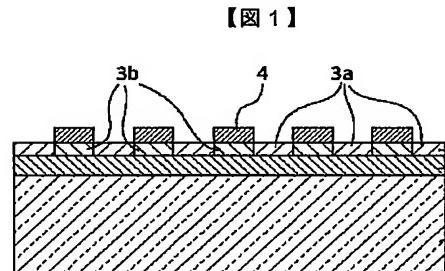
記核酸固定用基板に形成された第1の領域上に核酸が固定化されているので、核酸を第1の領域にのみ安定的に固定化することが可能となり、所望の規則的な配列パターンを有する核酸アレーヤ核酸チップを容易に得ることができる。

【0083】また、本発明に係る核酸の解析方法は、ガラスプレートの核酸固定用基板上に固定化されている核酸の解析を行うので、ガラスプレート上に規則的に配列された核酸試料を解析することにより、塩基配列の決定や感染症、遺伝的疾患等の種々の遺伝子解析を効率良く行うことが可能となる。

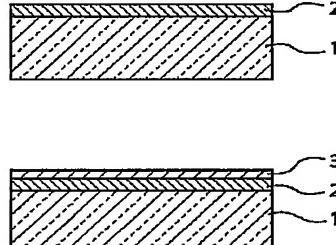
【0084】すなわち、本発明によれば、DNA等の核酸を効率よく安定にガラス基板上の所望領域のみに固定させることができ、ハイブリダイゼーション法により遺伝子を解析する場合でも、核酸の固定化が所望の領域のみに行われることとなって、高感度で少量物質の検出にも利用することができ、安定的に固定化されているため再現性や定量性にも優れたものとなる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明に係る核酸固定用基板の一実施の形態

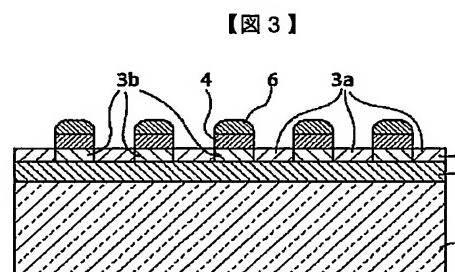


(a)  
(b)

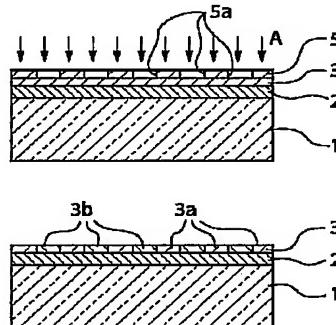


【図2】

【図5】



(c)  
(d)



(e)

(第1の実施の形態)を示す要部断面図である。

【図2】本発明に係る核酸固定用基板の製造方法の一実施の形態を示す製造工程図である。

【図3】上記核酸固定用基板の所望領域に核酸が固定された状態を模式的に示したガラスプレートの要部断面図である。

【図4】本発明に係る核酸固定用基板の第2の実施の形態を示す要部断面図である。

【図5】接触角の測定方法を説明するための説明図である。

【符号の説明】

- |    |          |
|----|----------|
| 1  | ガラス基板    |
| 2  | 光触媒層     |
| 3  | 薄膜       |
| 3a | 第2の領域    |
| 3b | 第1の領域    |
| 4  | 核酸固定用化合物 |
| 5  | フォトマスク   |
| 6  | 核酸       |
| 7  | 混成膜      |

10

20

## フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7  
G 01 N 37/00

識別記号  
102

F I  
C 12N 15/00

テ-マコ-ト(参考)  
F